

「生命現象の解明と応用に資する新しい計測・分析基盤技術」
平成 18 年度採択研究代表者

宮澤 淳夫

(独)理化学研究所放射光科学総合研究センター・グループディレクター

細胞内標識による生物分子トモグラフィー

1. 研究実施の概要

生物試料の電子線トモグラフィー観察に向けて、電子顕微鏡で検出可能な細胞内分子標識法の開発を行っている。これまで、金属結合タンパク質であるメタロチオネイン(MT) 3分子を、タンデムにつないだ標識タグ(3MT)が遺伝的にコード化できる標識として有用であることを示してきた。今年度は、ポストシナプスに集積する PSD-95 を 3MT で標識し、細胞内に形成される「3MT+金属クラスター」の電子線トモグラフィーによる三次元再構築を行った。その結果、3MT 標識タンパク質の細胞内での立体構造や三次元配置を解析するのに電子線トモグラフィーが有用であることを示した。また、3MT 標識はこれまで多量体を形成するオリゴマータンパク質や細胞内局所で集積するクラスタータンパク質に応用してきたが、今年度は繊維状タンパク質である F-アクチンの 3MT 標識の検討を開始した。さらに、MT 以外の金属結合モチーフとして、カドミウムと結合する性質をもつフィトケラチンアナログを利用することで、3MT よりも高いタグ 1kDa あたりのカドミウム含有量が得られることが示された。

また、クライオ電子線トモグラフィーの実施に向けて、大腸菌だけでなくヒト血小板を用いて、手動操作による氷包埋試料のクライオ電子線トモグラフィー観測、およびデータを収集し、クライオ電子線トモグラフィーにおける解析の重要な問題点を明らかにした。そして、最新の試料作製技術である CEMOVIS (Cryo Electron Microscopy Of Vitreous Ice) の改善に成功し、これにより、技術のみが先行しその信頼度等が評価されてきていなかったこれらのクライオ方法について、我々のグループで検証できる体制が整った。

さらに、電子顕微鏡のシステム開発においては、国産の電子顕微鏡に対し、クライオ電子線トモグラフィーに必要なモジュールとして、傾斜シリーズ撮影モジュールを開発中である。3次元再構築に関しては、1軸、および2軸傾斜共に分子レベルの電子線トモグラフィーが可能なパッケージを更に改善し、傾斜角度の精密化やデフォーカスによる像変形の改善が行えるようになった。

2. 研究実施内容

<分子ラベル開発グループ>

昨年度、ポストシナプスに集積する性質をもつ PSD-95 が、3MT 標識によって、ポストシナプス内の電子密度の高い領域として観察されることを報告した。今年度は、この細胞内に観察された電子密度の高い領域の電子線トモグラフィーによる解析を行った。試料切片を電子顕微鏡に取り付けたトモグラフィーシステムによって±60度傾斜させ、1度ずつの傾斜像を撮影した。その後、三次元再構築ソフトウェアを用いて、得られた傾斜シリーズから三次元再構築を行った。その結果、電子密度の高い領域は切片内で楕円体状に集積していることがわかった。金コロイド抗体を用いた免疫電子顕微鏡法では、目的タンパク質の存在位置の情報しか得られないのに対し、3MT で標識されたタンパク質に電子線トモグラフィーを応用すれば、目的タンパク質の細胞内配置と共に、目的タンパク質が細胞内で形成するクラスターの立体構造の解析も可能になることが確かめられた。

電子顕微鏡観察のための 3MT を用いた細胞内分子標識法の種々生体内タンパク質への応用の一つとして、興奮性神経細胞のスパインに高濃度に存在する線維状タンパク質である F-アクチンの検討を開始した。神経興奮やシナプスの発達によってスパインの形態が大きく変化することから、スパイン内 F-アクチンの動態も変化していることが予想され、細胞機能と関連した分子の構造変化を電子顕微鏡で可視化するための検討例として適していると考えている。まず始めに、細胞において F-アクチンへの線維化を阻害しない 3MT 標識β-アクチンのコンストラクトを作製した。また海馬初代培養細胞において、3MT の融合が F-アクチンのスパインへの局在に影響しないことを確認した。さらに MT に結合させるためのカドミウムについて、神経細胞におけるβ-アクチン発現量および F-アクチン形成に影響を及ぼさない処置濃度と添加時間を決定した。

MT以外の金属結合モチーフについても、遺伝的な標識タグとしての可能性を検討した。フィトケラチンは植物に存在するGluとCysのくり返し配列から成るγアミノ酸ペプチドで、カドミウムイオンと結合することが知られている。このαアミノ酸アナログもカドミウム結合能を持ち合わせている。そこで、GluとCysを20個交互に連結したαアミノ酸配列(EG20)をMT1分子の直後に融合させた標識タグ(MT-EG20)を作製し、GroELの各サブユニットに融合させた。精製タンパク質は、GroEL-3MTと同様に電子顕微鏡下で明確な電子密度として検出された。MT-EG20タグに取り込まれたカドミウム含有量を測定したところ、3MTと比較して、タグの分子量1kDaあたりのカドミウム結合量を上昇させることができた。

<電子線トモグラフィー観測グループ>

今年度は、まず、手動によりクライオトモグラフィーを大腸菌だけではなく、ヒト血小板についても行った。手動による低電子線照射システムの撮影のため、全傾斜シリーズを通して同一領域を撮影領域に収め、損傷を抑えつつ撮影するのは困難を極めたが、昨年度と同じく 60 枚近くの撮影を複数の試料について撮影することに成功した。実際に得られた氷包埋の傾斜像から、解析過程におけるアライメントが非常に難しく、来年度の大きな課題となった。分子分解能を目指した試料作製法の確立として、CEMOVIS を昨年度よりも安定かつ歪みの少ない状態で実行できるように試料作製技術の取得と改良を今年度行った。ライカマイクロシステムズや海外留学生の協力を得て、非常に質の良い CEMOVIS の作製とそのクライオ電子顕微鏡による撮影に成功した(図1)。昨年度は、ダイヤモンドナイフの切削による歪みが大きかったが、今年度は大きく改善した。特に

今年度は、様々な工夫によって成功率が非常に上昇し、試料によっては、ほぼ、100%の確率でCEMOVISが得られるようになった。これにより、無染色・無化学固定の細胞、組織の切片を水和した状態で観察することが可能になった、だけでなく、これまでできていなかったこれら技術の比較検討が可能になった。

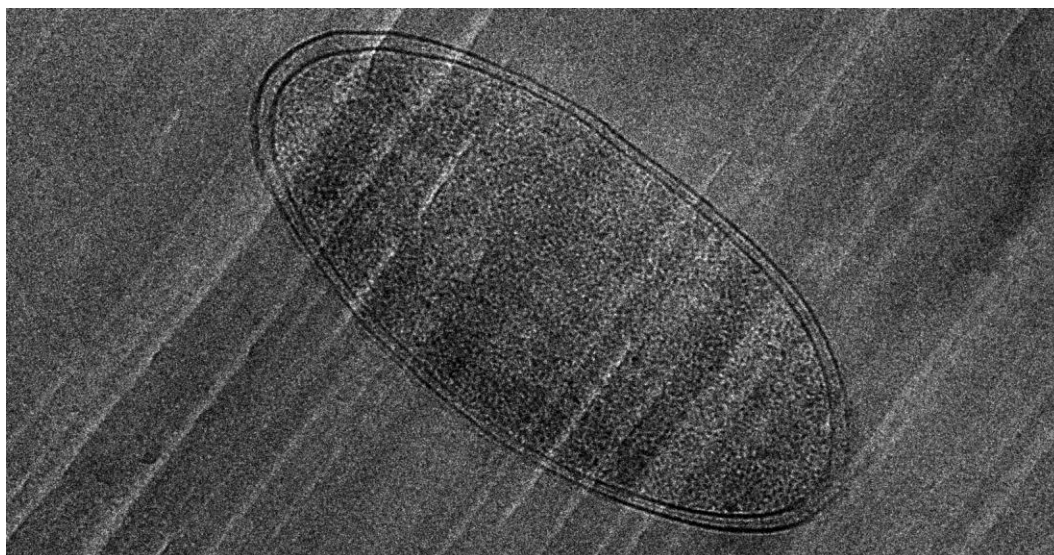
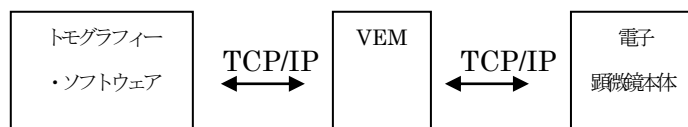


図1:大腸菌のCEMOVIS

<システム開発グループ>

日本電子社製JEM2100に対して、傾斜シリーズ撮影条件の検討を行い、8千倍程度の低倍での視野探索と4万倍程度の高倍でのフォーカス、撮影が可能な条件を見いだした。また、付属の傾斜シリーズ撮影ソフトウェアの検証を行い、問題点を洗い出した。現在、ソフトウェアのソースコード提供等の共同開発を試みている。傾斜シリーズ撮影モジュールの概要設計を終了し、実装を開始した。仮想的な電子顕微鏡システム(VEM)を作成することで、異なる電子顕微鏡機器の違いを吸収し、共通のクライオトモグラフィー・ソフトウェアとして実行できるシステムとして設計し、実装した。各ソフトウェア間は、TCP/IPのソケットにより通信を行うことで、計算機そのものもネットワーク上から使用できるものとしている(下図参照)。



また、3次元再構成に関して、更に、画像処理アルゴリズムを改善し、ソルベント・フラットニング等を導入することで画像の改善を得た。現在、超解像法に導入を試みている。また、FOM法などにより画像とモデル画像の正当性を評価するアルゴリズムをシステム内に導入した。画像処理全体を高速化するために、GPUによる高速化を試みている。

3. 研究実施体制

(1)「分子ラベル開発」グループ

①研究分担グループ長:宮澤 淳夫((独)理化学研究所、グループディレクター)

②研究項目

金属結合タンパク質標識した生体内タンパク質の三次元構造解析

金属結合タンパク質標識の種々タンパク質への応用

フィケラチンアナログを利用したタンパク質標識の検討

(2)「電子線トモグラフィー観測」グループ

①研究分担グループ長:岩崎 憲治(大阪大学、准教授)

②研究項目

極低温電子顕微鏡を用いたクライオトモグラフィー撮影条件と解析方法の探索

再現性ある CEMOVIS 作製方法の改良

(3)「システム開発」グループ

①研究分担グループ長:安永 卓生(九州工業大学大学院、教授)

②研究項目

標識タンパク質を用いた新規トモグラフィー・アルゴリズムの探索

生物分子トモグラフィーのための電子顕微鏡制御システムの開発

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表 (原著論文)

1. Ueno H., Yasunaga, T., Shingyoji, C., and Hirose, K.: Dynein pulls microtubules without rotating its stalk, *ProNAS*, 105, 19702-19707, 2008
2. Liu Z., Takazaki H., Nakazawa Y., Sakato M., Yagi T., Yasunaga T., King S.M., and Kamiya R.: Partially functional outer arm dynein in a novel *Chlamydomonas* mutant expressing a truncated γ heavy chain, *Eukaryotic Cell*, 7, 1136-1145, 2008
3. Murakami K., Stewart M., Nozawa K., Tomii K., Kudou N., Igarashi N., Shirakihara Y., Wakatsuki S., Yasunaga T., and Wakabayashi T.: Structural basis for tropomyosin overlap in thin (actin) filaments and the generation of a molecular swivel by troponin-T., *ProNAS*, 105(20), 7200-7205, 2008
4. Yasunaga, T. and Wakabayashi, T.: Evaluation of a 2k CCD camera with an epitaxially-grown CsI scintillator for recording energy-filtered electron cryo-micrographs., *Journal of Electron Microscopy*, 57(3), 101-112, 2008
5. Iwasaki K., Miyazaki N., Hammar L., Zhu Y., Omura T., Wu B., Sjöborg F., Yonekura K., Murata K., Namba K., Caspar D.L., Fujiyoshi Y. and Cheng R.H. : Pleomorphic Configuration of the Trimeric Capsid Proteins of Rice dwarf virus that Allows Formation

- of Both the Outer Capsid and Tubular Crystals. *J. Mol. Biol.*, 383, 252-265, 2008
6. Aoyama K., Takagi T., Hirase A., and Miyazawa A. : STEM tomography for thick biological specimens, *Ultramicroscopy*, 109, 70-80, 2008

(2) 特許出願

平成 20 年度 国内特許出願件数 : 0 件 (CREST 研究期間累積件数 : 1 件)